



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

15 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

☎ N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES

DATE

20 OCT 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0312228

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

20 OCT. 2003

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240963 D21711 NT

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

☐

brevet européen *Demande de brevet initiale*

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

UTILISATION DE CATIONS METALLIQUES DIVALENTS POUR L'AMELIORATION DE L'ACTIVITE
FONCTIONNELLE DES ANTICORPS.

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale ☐ Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES
BIOTECHNOLOGIES

Prénoms

Forme juridique

GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC

N° SIREN

180036147

Code APE-NAF

Domicile

Rue

Zone d'activité de Courtaboeuf 3, avenue des Tropiques 91940 LES
ULIS FRANCE

ou

siège

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

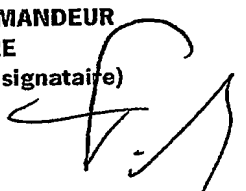
N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

BES1 AVAILABLE COPY

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 20 OCT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0312228 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		240963 NT Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)  92-1001		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET

BEST AVAILABLE COPY

- 5 La présente invention concerne l'utilisation de cations métalliques divalents, notamment du Zinc, pour améliorer l'activité fonctionnelle d'anticorps. Plus particulièrement, l'invention a pour objet des compositions pharmaceutiques d'anticorps comprenant des cations métalliques divalents.
- 10 L'immunothérapie passive, très répandue, est au cœur des pratiques du LFB. Elle est fondée sur l'administration d'anticorps, par exemple des anticorps monoclonaux dirigés contre une cellule ou une substance donnée. L'immunothérapie passive au moyen d'anticorps monoclonaux a donné des résultats encourageants. Toutefois, si l'utilisation d'anticorps monoclonaux possède plusieurs avantages, comme des prix de
- 15 revient raisonnables et une assurance de sécurité du produit quant à l'absence de contamination, il peut en revanche s'avérer difficile d'obtenir un anticorps monoclonal efficace.
- En effet, le risque est de développer un anticorps monoclonal qui s'avère peu efficace
- 20 et pour lequel on observe des effets secondaires incompatibles avec une utilisation en thérapie clinique. Ces deux aspects sont étroitement liés sachant que des anticorps peu actifs sont administrés à fortes doses pour compenser et obtenir une réponse thérapeutique. L'administration de forte dose induit non seulement des effets secondaires mais est économiquement peu viable.
- 25 Ces problèmes sont majeurs dans le développement industriel des anticorps monoclonaux, chimériques humanisés ou humains. A titre d'exemple, la société Protein Design Labs a suspendu les essais cliniques en phase I/II du Remitogen®, qui est un anticorps anti-HLA-DR pouvant être utilisé pour traiter les cancers de cellules
- 30 MHC de classe II positives, notamment les leucémies des cellules B et T.

Aujourd'hui, la recherche est orientée sur le fragment Fc γ de l'immunoglobuline afin d'améliorer les propriétés fonctionnelles des anticorps. A terme, cela devrait permettre l'obtention d'anticorps qui interagissent et activent les récepteurs des cellules effectrices (monocytes macrophage, lymphocyte B, cellules NK et dendritiques). La région Fc est constituée de 2 domaines globulaires nommés C γ 2 et C γ 3. Les 2 chaînes lourdes interagissent étroitement au niveau des domaines C γ 3 tandis qu'au niveau des domaines C γ 2, la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un oligosaccharide lié à l'Asn 297 contribue à un écartement des 2 domaines.

10

Ainsi, le problème est de savoir si la structure tridimensionnelle de ces domaines peut influencer l'activité des anticorps.

Dans notre demande de brevet WO 01/77181, nous avons démontré que la glycosylation du Fc est essentielle pour l'activité biologique des IgG, particulièrement pour la lyse cellulaire médiée par le complément (CDC) et la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Nous montrons qu'une structure de type biantennée, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, une faible fucosylation, des mannoses terminaux et/ou GlcNac terminaux non intercalaires est le dénominateur commun des structures glycaniques conférant une forte activité ADCC aux anticorps monoclonaux. Par la suite, notre découverte a été corroborée par les études de Shields et *al.*, 2002 et Shinkawa et *al.*, 2003.

Dans le cadre de l'invention, nous avons déterminé la structure tridimensionnelle de différents anticorps et comparé les structures d'anticorps présentant une forte activité fonctionnelle avec des anticorps produits dans CHO qui sont peu efficaces, notamment en ADCC.

Nous avons découvert la présence d'un ion zinc situé entre les domaines CH2 et CH3, plus précisément sur certains résidus localisés à l'interface CH2-CH3 impliqué dans la reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps par le récepteur Fc γ Rn ainsi que dans la

fixation à la protéine A, issue de la paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus*. De manière inattendu, le Zinc est présent dans les anticorps présentant une forte activité fonctionnelle et est absent dans les anticorps présentant une faible activité fonctionnelle.

5

De part sa localisation sur le fragment Fc, cet atome de zinc joue un rôle important dans la conformation générale du fragment Fc, et par là même est à l'origine de l'amélioration de la liaison du fragment Fc à ses récepteurs. On entend par récepteurs non seulement les molécules de Fc γ R présentes sur les cellules du système immunitaire telles les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et T, les cellules NK et les cellules dendritiques mais également les molécules du complément et celles des parois bactériennes.

10

D'autre part, nos études de la structure tridimensionnelle de ces anticorps ont révélé une conformation dite ouverte dans les anticorps présentant une forte activité fonctionnelle se distinguant nettement des sssconformation dite fermée des anticorps peu efficaces, la conformation ouverte favorisant la liaison à un ion Zinc. Ainsi, il est désormais possible de potentialiser l'activité des anticorps monoclonaux ou polyclonaux au moyen de cations divalents.

15

20

Description

Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention a pour objet une méthode pour potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps via le fragment Fc, comprenant une étape consistant à ajouter une quantité appropriée d'un ou plusieurs ion(s) divalent(s), notamment du Zinc, dans le système biologique produisant les anticorps ou dans une solution comprenant des anticorps avant ou après purification ou encore dans la formulation finale sous la forme d'une solution injectable des anticorps.

25

En d'autres termes, l'invention concerne une méthode pour augmenter l'activité effectrice des anticorps comprenant l'ajout de cations métalliques divalents à des anticorps thérapeutiques.

- 5 Cette potentialisation conduit à l'obtention et l'utilisation de nouveaux anticorps comprenant un cation divalent, notamment un ion zinc, lesdits anticorps présentant une efficacité accrue pour les traitements thérapeutiques.

10 En effet, la présence d'un atome de zinc a été montré lors de la présente invention dans le domaine de liaison aux récepteurs Fc des anticorps présentant une forte activité ADCC.

Dans un deuxième aspect, l'invention concerne des anticorps possédant un atome de zinc liés aux résidus His 310 et His 435. L'invention concerne aussi lesdits anticorps
15 possédant un atome de zinc lié aux résidus His 310, His 435 et Asn 434.

Par exemple, l'anticorps peut être sélectionné parmi les anti Ep-CAM, anti-KIR3DL2, anti-VEGFR, anti HER1, anti HER2, anti GD, anti GD2, anti GD3, anti CD-23, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD44, anti CD52, anti CA125 et anti ProteinC; anti
20 Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti-HLA-DR, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti-CD20, anti CD-23 et anti ProteinC; les anti-viraux: HBV, HCV, HIV et RSV, des anti-idiotypes spécifiques d'inhibiteurs par exemple de facteurs de coagulation dont le FVIII et FIX.

25 On entend par système biologique des lignées cellulaires, des plantes ou animaux transgéniques non humains. Parmi les cellules, on peut choisir des cellules provenant de lignées cellulaires, transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps, par exemple des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures. Plus
30 spéciquement, on peut utiliser des cellules de myélome de rat telle que YB2/0.

On peut également erutilisé des cellules CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr; Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653. Dans ce cas, il est possible de
 5 modifier génétiquement ces cellules par introduction d'une ou plusieurs séquence(s) exprimant une ou plusieurs glycosyl transférase(s), notamment une galactfucosyl-transférase.

On peut également produire les anticorps dans tous les systèmes biologiques
 10 couramment utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, hormis le corps humain, qui seront modifiés par ingénierie moléculaire de manière à créer un site de fixation pour le zinc entre les deux domaines CH2 et CH3 sur le fragment Fc. Ces modifications comprennent la ,modification de la séquence en acide aminé de sorte à obtenir des anticorps présentant une conformation tridimensionnelle ouverte
 15 permettant la fixation du cation, notamment du Zinc.

Ainsi, l'invention vise les anticorps produits par génie génétique de manière à ce qu'ils comportent un ou plusieurs sites de liaison pour des caactions métalliques divalents, de manière à améliorer la fixation des cations métalliques divalents sur les anticorps. De
 20 préférence, les cations métalliques divalents sont des ions zinc.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, et sont préférentiellement des IgG humaines ou ayant un fragment Fc humain. Les anticorps monoclonaux venpeut être des anticorps monoclonaux chimériques,
 25 humanisés ou humains.

De plus, l'invention concerne l'utilisation de cations métalliques divalents pour améliorer l'activité fonctionnelle d'anticorps. On entend par amélioration de l'activité fonctionnelle des anticorps l'augmentation de l'activité lytique des anticorps, c'est-à-
 30 dire l'augmentation de leur activité ADCC et/ou CDC. Cette amélioration

fonctionnelle s'accompagne d'un renforcement du pontage entre les domaines CH2-CH3, qui est lui-même une cause de l'amélioration de l'activité fonctionnelle de ces anticorps.

- 5 De manière préférentielle, les cations divalents sont des ions zinc.

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques comprenant au moins un excipient et des cations divalents, de préférence du zinc. Les anticorps de la composition pharmaceutique sont des anticorps
 10 monoclonaux ou polyclonaux. Ces anticorps peuvent être des IgG. Préférentiellement des IgG humaines ou ayant un fragment Fc humain.

Par exemple, l'invention porte sur une composition pharmaceutique comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps polyclonaux, notamment un anticorps
 15 monoclonal chimérique, humanisé ou humain et une quantité au moins équimolaire d'un ion Zinc.

Ladite composition peut être formulée sous la forme d'une solution injectable par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ... Ainsi, l'invention porte sur une
 20 solution injectable comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps polyclonaux et une quantité appropriée en ion zinc, par exemple une concentration en ion zinc au moins égale à la concentration en anticorps.

A titre d'exemple, l'invention se rapporte à une composition ou solution injectable mentionnée ci-dessus contenant un anticorps choisie parmi les anticorps du Tableau
 25 I ci-après :

Tableau I :

Nom et marque commerciale de l'anticorps	Société	cible	indication
Edrecolomab PANOREX	Centocor	anti Ep-CAM	colorectal cancer colorectal

Rituximab RITUXAN	Idec Licencié à Genentech/ Hoffman la roche	anti CD20	B cell lymphoma thrombocytopenia purpura
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech Licencié à Hoffman la roche/Immunogen	anti HER2	ovarian cancer ovarien
Palivizumab SYNAGIS	Medimmune Licencié à Abott		RSV
Alemtuzumab CAMPATH	BTG Licencié à Schering	anti CD52	leukemia
ibritumomab tiuxetan ZEVALIN	IDEC Licencié à Schering	anti CD20	NHL
Cetuximab IMC-C225	Merck /BMS / Imclone	anti HER1	cancers
Bevacizumab AVASTIN	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGFR	cancers
Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	cancers: non hogkin e non hogkinienlymphoma cancers
Hu M195Mab	Protein Design Labs	ND	
MDX-210	Immuno-Designed Molécules	ND	cancers
BEC2 Mitumomab	Imclone	anti GD3	cancers
Oregovomab OVAREX	Altarex	anti CA125	Ovarian cancer ovarien
Ecromeximab KW-2971	Kyowa-Hakko	anti GD	malignant e malinmelanoma
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cancers

MDX010	Medarex	ND	Cancers
XTL 002	XTL	ND	anti-viral : HCV
H11 SCFV	biopharmaceuticals viventia biotech	ND	cancers
4B5	viventia biotech	anti GD2	Cancers
XTL 001	XTL	ND	anti-viral : HBV
MDX-070	biopharmaceuticals MEDAREX	Anti-PSMA	Prostate cancer de la Prostate
TNX-901	TANOX	anti CD-23	
IDEC-114	IDEC	inhibition ProteinC	non-Hodgkin e non- Hodgkinienlymphoma

L'invention vise également une composition pharmaceutique comprenant des anticorps dans laquelle au moins 50%, 60%, 75%, 80%, ou 90%, ou encore 95%, ou 99% des anticorps possèdent un ion zinc lié, notamment lié aux acides aminés His 310, His 435 et Asn 434.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'ions zinc pour améliorer la cristallisation d'anticorps thérapeutiques, et plus particulièrement des IgG monoclonaux, ladite cristallisation permettant d'obtenir la structure tridimensionnelle de tout ou partie de l'anticorps plus particulièrement en vue de vérifier si la conformation du Fc de l'anticorps est optimale pour assurer une bonne efficacité. L'invention porte donc également sur un test permettant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps par étude de la conformation 3D du domaine impliquant His 310, His 435 et Asn 434 telle que montrée à la figure 1 ou 2 ou encore un dosage de la teneur en Zinc desdits anticorps, la présence de zinc étant une indication de l'efficacité de l'anticorps.

EXEMPLE 1.

Afin d'acquérir des données nouvelles sur les relations structure-fonction de la région Fc des anticorps, le demandeur a comparé la structure tridimensionnelle du fragment Fc de l'anticorps monoclonal T125 exprimé dans YB2/0 et CHO. Une étude en diffraction X des deux fragments cFc cristallisés a été entreprise.

Anticorps monoclonal : R297 (T125-YB2/0). Il s'agit d'une IgG1(κ) humaine, dirigée contre l'antigène Rh(D), produite dans la lignée cellulaire YB2/0 (myélome de rat, lignée ATCC n° 1662) adaptée à la culture en milieu sans sérum.

- Purification : R297 a été purifié par chromatographie d'affinité sur Sépharose-protéine A.
- Analyse glycanique : par HPCE-LIF, il a été montré que la structure majoritaire est un oligosaccharide de type biantenné, contenant environ 25 % de fucose.
- Activité biologique : l'activité ADCC de R297 est au moins égale à celle de l'anticorps polyclonal anti-Rh(D) de référence, WinRho.

Préparation du fragment Fc :

- Conditions d'hydrolyse : L'anticorps purifié T125-YB2/0 est dialysé une nuit contre du tampon Tris 50 mM, pH 8.0. La solution d'Acm, ajustée à 50 mM CaCl₂ et 10 mM cystéine, est incubée 30 min. à 37°C avant d'ajouter la solution de trypsine (1 mg/ml) dans un rapport enzyme/substrat de 1/25. Après 5 h. d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par l'addition de diisopropyl fluorophosphate (1 mM final). L'hydrolysate est dialysé une nuit contre du tampon Imidazole 50 mM, pH 7.8.

- Purification du fragment Fc : L'hydrolysate dialysé est mis en contact avec de l'Affarose-protéine L à raison de 1 ml de gel pour 3.6 mg d' Acm. Après 4 h. d'incubation à température ambiante sous agitation, le gel est monté en colonne et lavé par le tampon Imidazole 50 mM, pH 7.8. L'effluent et le tampon de lavage qui

contiennent le fragment Fc sont réunis, concentrés par centrifugation sur Vivaspinn 20 en utilisant les conditions décrites par le fabricant.

Cristallogénèse : Après mise au point, les conditions de cristallisation retenues sont les suivantes : le fragment Fc, à 2 mg/ml en tampon Imidazole 50 mM, pH 7.8, est amené à 10% de monométhyl polyéthylène glycol 5 000, 100 mM cacodylate de sodium, 0.1 mM chlorure de zinc, pH 5.1. La température de cristallisation est de 17°C.

Collecte des résultats et détermination de la structure : L'analyse du cristal obtenu est réalisée au ESRF de Grenoble et les informations collectées sont traitées par les programmes DENZO et SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1996). La structure est déterminée en utilisant la suite de programmes CCP4 (1994).

15 Résultats

Le cristal du fragment Fc de T125-YB2/0 appartient au groupe spatial C222₁ dont les dimensions en Å sont les suivantes : a = 50.2 ; b = 147.7 ; c = 75.6.

L'analyse tridimensionnelle du fragment Fc de T125-YB2/0 permet de mettre en évidence que :

20 1°) la distance entre les 2 domaines C γ 2 d'une même molécule est relativement grande (Fig.1). La superposition avec le fragment Fc de l'Acm b12, IgG1 humaine dont la région Fc présente une structure primaire identique, mais produite dans CHO, montre que les domaines CH2 de T125-YB2/0 sont en conformation dite "ouverte" par rapport aux domaines CH2 de b12.

25

2°) la présence d'un atome de zinc entre les domaines CH2 et CH3 (Fig. 2). L'atome de zinc est lié aux résidus d'histidine 310 (CH2) et 435 (CH3) et au résidu d'asparagine 434 (CH3).

30 **Figure 1 :** Analyse cristallographique du fragment Fc de T125-YB2/0 (2Å).

Figure 2 : Site de fixation d'un atome de zinc entre les domaines Cy2 et Cy3

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

REVENDICATIONS

- 5 1. Anticorps possédant un atome de zinc sur les résidus His 310 et His 435.
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils possèdent un site de fixation pour le zinc comprenant les résidus His 310 et His 435 créé par ingénierie moléculaire.
- 10 3. Anticorps possédant un atome de zinc lié aux résidus His 310, His 435 et Asn 434.
4. Anticorps selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'ils possèdent un site de fixation pour le zinc comprenant les résidus His 310, His 435 et Asn 434 créé par ingénierie moléculaire.
- 15 5. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.
- 20 6. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'il s'agit d'IgG humaines ou ayant un fragment Fc humain.
7. Utilisation de cations métalliques divalents pour améliorer l'activité fonctionnelle d'anticorps.
- 25 8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que les cations divalents sont des ions zinc.

REVENDICATIONS

- 5 1. Anticorps possédant un atome de zinc sur les résidus His 310 et His 435.
2. Anticorps selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils possèdent un site de fixation pour le zinc comprenant les résidus His 310 et His 435 créé par ingénierie moléculaire.
- 10 3. Anticorps selon la revendication 1 possédant un atome de zinc lié aux résidus His 310, His 435 et Asn 434.
- 15 4. Anticorps selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'ils possèdent un site de fixation pour le zinc comprenant les résidus His 310, His 435 et Asn 434 créé par ingénierie moléculaire.
- 20 5. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.
6. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'il s'agit d'IgG humaines ou ayant un fragment Fc humain.
- 25 7. Utilisation de cations métalliques divalents pour la préparation d'une composition d'anticorps pour améliorer l'activité fonctionnelle desdits anticorps.
8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que les cations divalents sont des ions zinc.
- 30

9. Utilisation de cations métalliques selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps monoclonaux.
- 5 10. Utilisation de cations métalliques selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps polyclonaux.
- 10 11. Méthode pour potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps via le fragment Fc, comprenant une étape consistant à ajouter une quantité appropriée d'un ou plusieurs ion(s) divalent(s), notamment du Zinc, dans le système biologique produisant les anticorps ou dans une solution comprenant des anticorps avant ou après purification ou encore dans la formulation finale sous la forme d'une solution injectable des anticorps.
- 15 12. Méthode selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'on ajoute une concentration en ion zinc au moins égale à la concentration en anticorps.
- 20 13. Composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques selon les revendications 1 à 6 comprenant des cations divalents et au moins un excipient.
- 25 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que les cations métalliques sont des ions zinc.
- 15 15. Composition pharmaceutique comprenant des anticorps dans laquelle au moins 50%, ou 90%, ou encore 99% des anticorps possèdent un ion zinc lié, notamment lié aux acides aminés His 310, His 435 et Asn 434.
- 30 16. Solution comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps polyclonaux et une quantité appropriée en ion zinc, en particulier une concentration en ion zinc au moins égale à la concentration en anticorps, ladite solution étant adaptée pour une injection par voie intraveineuse, intramusculaire, ou sous-cutanée.

9. Utilisation de cations métalliques selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps monoclonaux.
- 5 10. Utilisation de cations métalliques selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que les anticorps sont des anticorps polyclonaux.
- 10 11. Méthode pour préparer une composition d'anticorps dans laquelle l'activité fonctionnelle des anticorps via le fragment Fc est potentialisée, comprenant une étape consistant à ajouter une quantité appropriée d'un ou plusieurs ion(s) divalent(s), notamment du Zinc, dans le système biologique produisant les anticorps ou dans une solution comprenant des anticorps avant ou après purification ou encore dans la formulation finale sous la forme d'une solution injectable des anticorps.
- 15 12. Méthode selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'on ajoute une concentration en ion zinc au moins égale à la concentration en anticorps.
- 20 13. Composition pharmaceutique comprenant des anticorps selon l'une des revendications 1 à 6, des cations métalliques divalents et au moins un excipient.
- 25 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que les cations métalliques sont des ions zinc.
- 15 15. Composition pharmaceutique comprenant des anticorps dans laquelle au moins 50%, ou 90%, ou encore 99% des anticorps possèdent un ion zinc lié, notamment lié aux acides aminés His 310, His 435 et Asn 434.
- 16 16. Solution comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps polyclonaux et une quantité appropriée en ion zinc, en particulier une concentration en ion zinc

17. Utilisation d'ions zinc pour améliorer la cristallisation d'anticorps thérapeutiques.
- 5 18. Test permettant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps comprenant l'étude de la conformation 3D du domaine impliquant His 310, His 435 et Asn 434 telle que montrée à la figure 1 ou 2 ou encore un dosage de la teneur en Zinc desdits anticorps, la présence de zinc étant une indication de l'efficacité de l'anticorps.

au moins égale à la concentration en anticorps, ladite solution étant adaptée pour une injection par voie intraveineuse, intramusculaire, ou sous-cutanée.

- 5 17. Test permettant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps comprenant l'étude de la conformation 3D du domaine impliquant His 310, His 435 et Asn 434 telle que montrée à la figure 1 ou 2 ou encore un dosage de la teneur en Zinc desdits anticorps, la présence de zinc étant une indication de l'efficacité de l'anticorps.

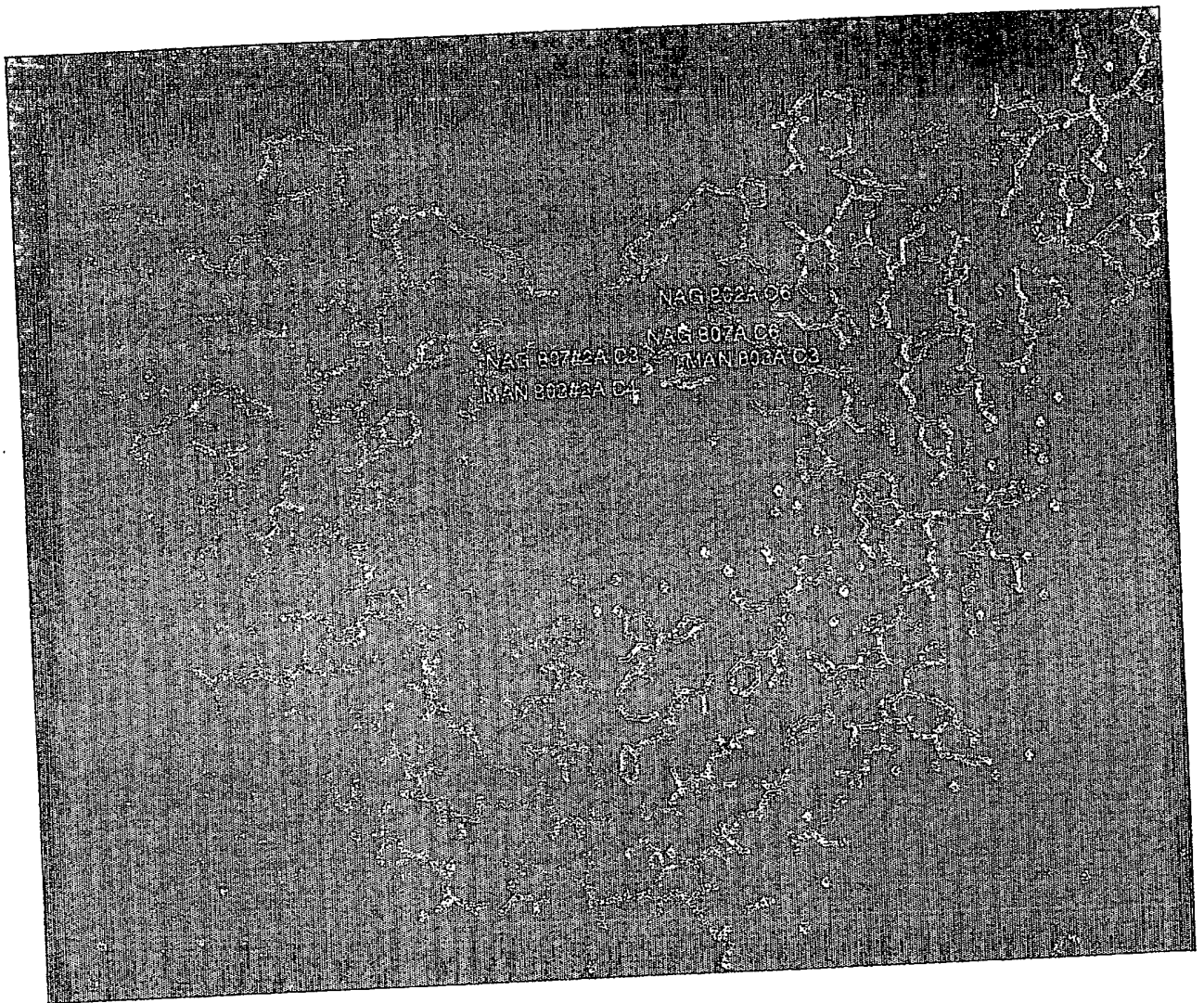


FIGURE 1

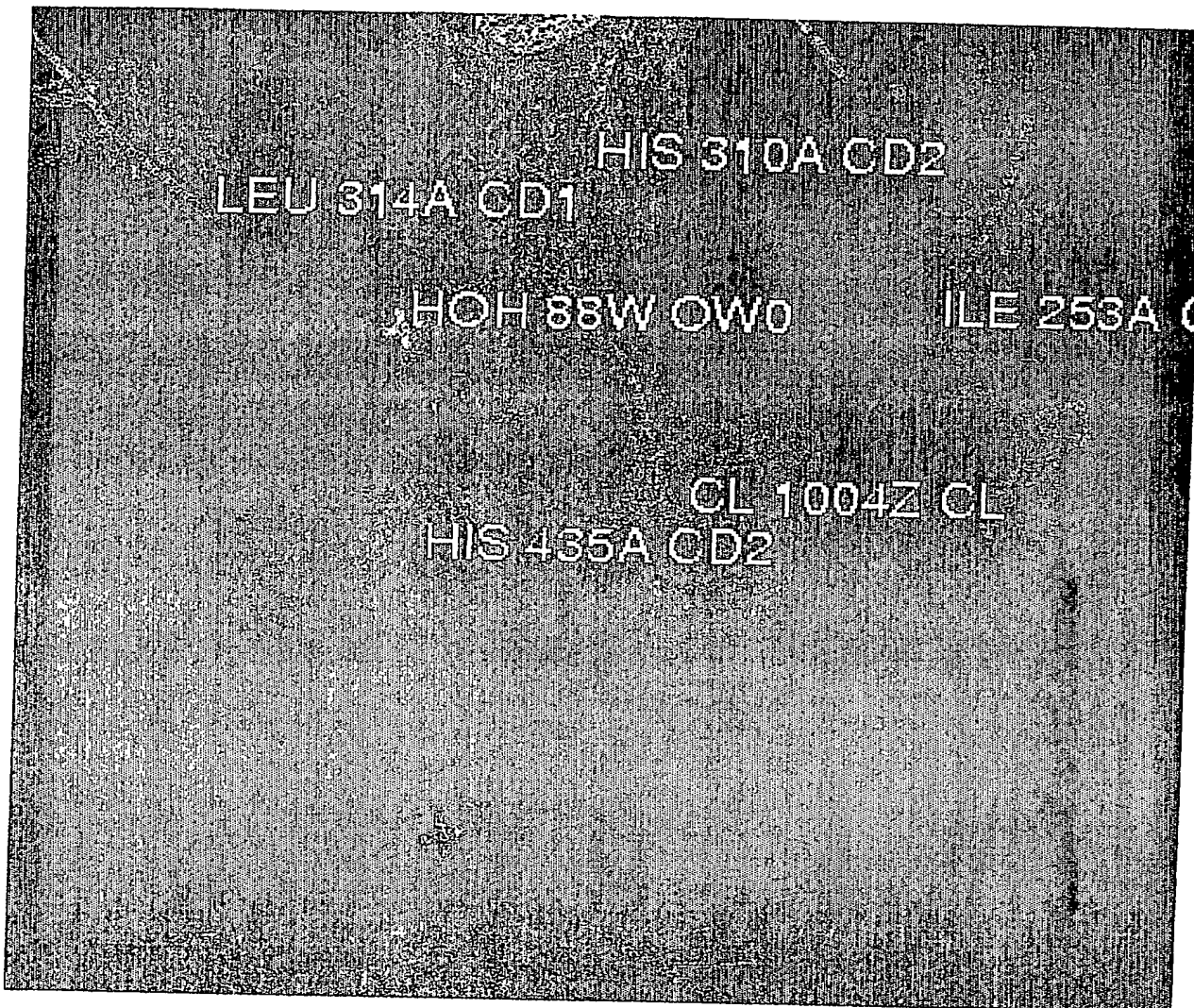



FIGURE 2

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240963 D21711 NT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0312228	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
UTILISATION DE CATIONS METALLIQUES DIVALENTS POUR L'AMELIORATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES ANTICORPS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES : Zone d'activité de Courtaboeuf 3, avenue des Tropiques 91940 LES ULIS FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :			
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BOUREL	
	Prénoms	Dominique	
Adresse	Rue	35, Avenue Germaine	
	Code postal et ville	59110 LA MADELEINE - FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GLACET	
	Prénoms	Arnaud	
Adresse	Rue	46, rue Ringot	
	Code postal et ville	59147 GONDECOURT - FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	JORIEUX	
	Prénoms	Sylvie	
Adresse	Rue	17 rue Molière	
	Code postal et ville	59650 VILLENEUVE D'ASCQ - FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
 92-1284 Christian TEXIER			



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous Informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

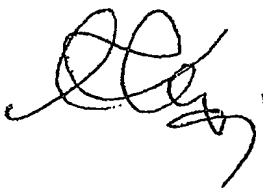
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ..2 / ..2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 6 W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240963 D21711 NT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0312228
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
<p align="center">UTILISATION DE CATIONS METALLIQUES DIVALENTS POUR L'AMELIORATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES ANTICORPS.</p>		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
<p align="center">LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES Zone d'activité de Courtaboeuf - 3 avenue des Tropiques - 91940 LES ULIS - FRANCE</p>		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	STURA
	Prénoms	Enrico
Adresse	Rue	Square Debussy
	Code postal et ville	78120 RAMBOUILLET - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	DUCANCEL
	Prénoms	Frédéric
Adressé	Rue	30, rue d'Alsace
	Code postal et ville	91160 LONGJUMEAU - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	TEILLAUD
	Prénoms	Jean-Luc
Adresse	Rue	41, rue des Archives
	Code postal et ville	75004 PARIS - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<p>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</p> <p align="center">  92-1284 christian TEXIER </p>		

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/002687

International filing date: 20 October 2004 (20.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0312228
Filing date: 20 October 2003 (20.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 March 2005 (04.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.